

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Aplicación de la prueba polimorfismo conformacional
de la hebra simple de ADN (SSCP) en la determinación
de la susceptibilidad a pirazinamida en
*Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Melissa Marlene Méndez Aranda

ASESOR

Amparo I. Zavaleta P.

Lima-Perú

2008

INDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	7
I. Generalidades.....	10
I.1 Pirazinamida.....	10
I.1.1 Historia.....	10
I.1.2 Propiedades químicas.....	10
I.1.3 Mecanismo de Acción.....	11
I.1.4 Actividad in vitro.....	13
I.1.5 Actividad in vivo.....	14
I.1.6 Actividad en humanos.....	15
I.2 Resistencia a PZA.....	15
I.3 Pruebas de Susceptibilidad a PZA.....	17
I.3.1 Pruebas basadas en el cultivo.....	18
I.3.2 Pruebas basadas en la actividad enzimática.....	20
I.3.3 Pruebas moleculares.....	22
II. Parte Experimental.....	25
II.1 Materiales y Equipos.....	25
II.2 Lugar de ejecución de la tesis.....	26
II.3 Métodos.....	26
II.3.1 Colección de muestras clínicas.....	26
II.3.2 Microscopía y Cultivo microbiológico.....	26
II.3.3 Resistencia a drogas de primera línea.....	27
II.3.4 Pruebas de Susceptibilidad a PZA.....	28

II.3.4.1 BACTEC™-460TB.....	28
II.3.4.2 Test de Wayne.....	28
II.3.4.3 SSCP.....	28
II.3.4.4 Secuenciamiento.....	30
III. Resultados.....	31
IV. Discusión.....	37
V. Conclusiones.....	40
VI. Recomendaciones.....	41
VII. Referencias Bibliográficas.....	42
Anexo 1.....	48
Anexo 2.....	49

ABREVIATURAS

EMB: Etambutol

INH: Isoniazida

MDR-TB: Tuberculosis multidrogo-resistente

PCR: Polymerase chain reaction o Reacción en cadena de la polimerasa

***pncA*:** gen de la Pirazinamidasa

POA: Ácido Pirazinoico

PZA: Pirazinamida

PZAsa: Nicotinamidasa/Pirazinamidasa

RIF: Rifampicina

SM: Streptomycin

SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism o Polimorfismo Conformacional de la Hebra Simple de ADN

TB: Tuberculosis

RESUMEN

La pirazinamida (PZA) es una droga antituberculosa de primera línea, presenta gran actividad *in vivo*, sin embargo *in vitro* no es evidente a menos que el pH del medio sea ácido, lo que hace que la susceptibilidad sea difícil de determinar por métodos convencionales. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la prueba molecular Polimorfismo Conformacional de la Hebra simple de ADN (SSCP) en cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis*, así como comparar su desempeño con otras pruebas como son el BACTEC™-460TB, el test de Wayne y el secuenciamiento. Se utilizó la prueba molecular del SSCP para la determinación de la susceptibilidad a PZA trabajando con 157 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* provenientes del Área de Tuberculosis del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se modificó el protocolo del SSCP para detectar la susceptibilidad a PZA en cepas de *M. tuberculosis*; ésta técnica resultó ser la más rápida y más económica que el BACTEC™-460TB y el secuenciamiento del gen *pncA*. La sensibilidad del SSCP con respecto al BACTEC™-460TB, test de Wayne y secuenciamiento fue de 85.0%, 92.3% y 92.2%, mientras que la especificidad fue de 98%, 100% y 100% respectivamente. El 92.6% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA contenían una mutación en el gen *pncA*. Las mutaciones en este gen son el principal mecanismo de resistencia a PZA en los aislamientos clínicos estudiados. El SSCP es una técnica rápida y económica que presenta alta especificidad y sensibilidad en la detección de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA.

Palabras claves: *M. tuberculosis*, pirazinamida, SSCP, pruebas de susceptibilidad.

SUMMARY

Pyrazinamide (PZA) is an important first-line antituberculosis drug. In spite of its very high in vivo activity, its in vitro activity is not apparent unless an acidic environment is available, which makes PZA susceptibility testing difficult by conventional methods. Therefore, the objective of the present study was to evaluate a molecular method called Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates, and also to compare its performance with other tests, such as BACTEC™-460TB, Wayne test and sequencing. The SSCP method was used to determine PZA susceptibility in 157 clinical isolates of *M. tuberculosis* given by the Área of Mycobacterium. The SSCP was modified to determine PZA susceptibility in *M. tuberculosis* strains and turned out to be the fastest and more economic than BACTEC™-460TB and *pncA* sequencing. The sensitivity of the SSCP calculated based on BACTEC™-460TB, Wayne test and sequencing was 85%, 92.3% and 92.2%, while the specificity was 98%, 100% and 100%, respectively. 92.6% of the PZA-resistant *M. tuberculosis* strains contained a mutation in the *pncA* gene. Mutations in this gene are the major mechanism of PZA resistance in the clinical isolates studied. The SSCP is an economic and fast technique that presents high specificity and sensitivity for the detection of PZA-resistant *M. tuberculosis* strains.

Keywords: *M. tuberculosis*, PZA Resistance, SSCP, Susceptibility tests.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es un gran problema de salud pública a nivel mundial, con 9 millones de nuevos casos y 1.7 millones de personas que mueren por año, incluyendo 0.2 millones de personas infectadas con el VIH (1).

La emergencia de cepas de *M. tuberculosis* multidrogo-resistente (MDR) junto con la coinfección del virus del VIH ha puesto en riesgo el control de la tuberculosis (2). La tasa de mortalidad entre los pacientes de TB infectados con el VIH es mayor que en los no infectados (3). La resistencia a las drogas de primera línea puede tener un impacto negativo en el tratamiento de los pacientes y en el control de la transmisión, además representan un sobre costo económico-social para la comunidad y los programas de control. Por esta razón, es necesario detectar rápidamente estos casos para su oportuno tratamiento y evitar su diseminación (4).

La pirazinamida (PZA) es una droga antituberculosa de primera línea usada en combinación con la isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y el etambutol (EMB) en el tratamiento de corta duración (DOTS) recomendado por la Organización Mundial de la Salud. La PZA no tiene actividad en contra de *M. tuberculosis* bajo condiciones normales de cultivo a pH neutro, pero es activa en medio ácido a pH 5.5 y elimina los bacilos semi-durmientes que persisten en el medio ácido al interior de los macrófagos, característica que permite el acortamiento de la terapia de 9 a 6 meses, cuando es usada en conjunto con la INH y la RIF (2).

Estas condiciones para la actividad de la PZA hacen que las pruebas de susceptibilidad *in vitro* sean difíciles de realizar, ya que el crecimiento del *M. tuberculosis* es escaso en medio ácido y de por sí tarda de semanas a meses (5). Por estas razones no se determina la susceptibilidad a PZA en muchos laboratorios a nivel mundial de manera rutinaria, por tanto estudios de vigilancia sobre resistencia a la PZA son escasos. El método radiométrico BACTEC™-460TB usa un medio líquido ácido especial para PZA, es el más confiable y sirve de referencia, sin embargo es muy costoso para ser implementado en países de bajos recursos, además requiere medidas de seguridad especiales para la eliminación de desechos radioactivos (5, 6).

Se sabe que las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a PZA, requieren de una enzima pirazinamidasa (PZAsa) funcional mientras que las resistentes han perdido esta actividad. Un método alternativo es determinar la presencia de la actividad PZAsa como prueba de susceptibilidad a la droga mediante el cambio de color en el ensayo de Wayne que indica la conversión de PZA a ácido pirazinoico (POA), el cual requiere grandes cantidades de cultivo bacteriano, de lo contrario el cambio de color es difícil de evidenciar (5, 6, 7).

Los métodos moleculares basados en el análisis del ADN son una alternativa a los de susceptibilidad bacteriana, en el caso del *M. tuberculosis*, la diferencia en el tiempo de obtención de resultados sería mucho menor. Cuando el rol del gen de la PZAsa (*pncA*) fue descrito por primera vez, se vio la posibilidad de usarlo como marcador de resistencia a PZA (8, 9). Las diversas mutaciones en el gen *pncA* que conducen a la pérdida de la actividad de la PZAsa son responsables de la resistencia a la PZA y la mayoría de cepas resistentes a PZA presentan una mutación en este gen (7, 10, 11).

La detección de las mutaciones en el gen *pncA* podría ser usada para la identificación temprana de cepas resistentes a PZA e incrementar la eficiencia en la determinación de la susceptibilidad a PZA dadas las dificultades de las cepas sensibles al pH y discrepancias en los resultados de los diferentes métodos fenotípicos. Adicionalmente, el desarrollo de un Nested-PCR permitiría el análisis del *pncA* desde muestras clínicas como el esputo positivo a TB, de este modo, el tiempo de detección de la resistencia se vería reducido significativamente (8).

Para ello, es necesario conocer el polimorfismo genético del gen asociado a la resistencia en el área geográfica donde se pretenda implementar su uso. Poco se sabe sobre la prevalencia de la resistencia a PZA en el Perú, a pesar de que el 32% de pacientes con re-tratamiento de TB en el Perú se encuentran infectados con cepas resistentes a PZA (12).

En este estudio se han realizado modificaciones a la prueba del SSCP para detectar mutaciones en el gen *pncA* a partir de protocolos publicados por Scorpio y *col*, 1997 y Davies y *col*, 2000, para hacer posible su uso a partir de cultivos y servir de guía en las decisiones sobre el tratamiento de casos clínicos de manera confiable y rápida.

Objetivo General

- Aplicar la Prueba Polimorfismo Conformacional de la Hebra Simple de ADN (SSCP) en la determinación de la susceptibilidad a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos Específicos

- Evaluar el uso del SSCP en la determinación de la susceptibilidad a PZA en cepas de *M. tuberculosis*.
- Comparar el desempeño del SSCP frente a otras pruebas usadas para determinar la susceptibilidad a PZA como el BACTEC™-460TB, el test de Wayne y el secuenciamiento del gen *pncA*.
- Estudiar el polimorfismo del gen *pncA* en cepas de *M. tuberculosis* y determinar su relación con la resistencia a PZA.

I. GENERALIDADES

I.1 Pirazinamida

Es una importante droga de primera línea en el tratamiento de la TB. Tiene una actividad esterilizante remarcable. Cuando se adiciona a los regimenes que contienen rifampicina es responsable de la eliminación de la gran mayoría de las micobacterias persistentes y permite que el tratamiento sea reducido de 9 a 6 meses.

I.1.1 Historia

En 1945, Chorine descubrió que la nicotinamida tenía actividad inhibitoria contra el *M. tuberculosis*. En 1948, McKenzie de los Laboratorios Lederle encontró lo mismo. Posteriormente, estudios simultáneos en los laboratorios Lederle y Merck descubrieron que la PZA era el análogo sintético de nicotinamida más activo en un modelo murino de TB. Los mismos estudios conllevaron al descubrimiento de las potentes drogas antituberculosas isoniazida y etionamida. Un punto remarcable es que el descubrimiento de la actividad de la PZA fue posible debido a su inmediato ensayo en animales luego de su síntesis química. Probada en el tratamiento de pacientes tuberculosos demostró ser efectiva (13).

Existía la paradoja de actividad baja *in vitro* pero alta *in vivo*. Estudios en la Universidad Cornell, demostraron que la PZA es activa en contra del *M. tuberculosis* sólo a pH 5.5. Esto ocurre durante una inflamación activa debido a la producción de ácido láctico por las células inflamatorias. Luego se realizaron una serie de experimentos en ratones, combinando diferentes drogas y dosis, estos experimentos clásicos precedieron a los métodos modernos para la determinación de drogas antituberculosas y a los regimenes de tratamiento actuales. El grupo en Cornell también demostró por primera vez que la PZA es una prodroga cuya actividad depende de su conversión a ácido pirazinoico (POA) por una amidasa bacteriana (13).

I.1.2 Propiedades químicas

Tiene una fórmula de $C_5H_5N_3O$, su peso molecular es 123.1 y su punto de fusión de 188-189 °C. A temperatura ambiente se disuelve en agua a una concentración máxima de 15 mg/ml. Es muy poco soluble en disolventes orgánicos, en cambio el POA es

ligeramente soluble en agua, pero fácilmente soluble en solventes orgánicos, como el dimetilsulfóxido (DMSO), llegando a una concentración de 100 mg/ml (13).

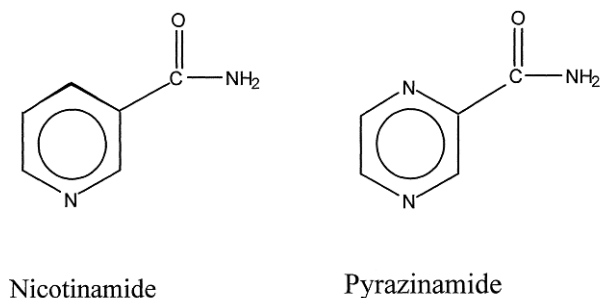


Figura 1. Estructuras de la nicotinamida y la PZA

I.1.3 Mecanismo de Acción

A pesar de la importancia de la PZA en el tratamiento de la TB, su mecanismo de acción es probablemente el menos entendido entre todas las drogas antituberculosas (14). La PZA es una prodroga que tiene que ser convertida a su derivado activo POA por la nicotinamidasa/pirazinamidasa micobacteriana para ser efectiva en contra del *M. tuberculosis* (Figura 2). El POA se forma inicialmente en el citoplasma como anión POA, el cual no tiene actividad bactericida, luego es excretado y bajo condiciones ácidas se forma el derivado protonado POA (HPOA), que reingresa a la célula, se acumula y causa daño celular (13, 14).

Nicotinamidasa/Pirazinamidasa (PZAsa)

La nicotinamida y la PZA son convertidas a sus respectivas formas ácidas por la enzima nicotinamidasa también llamada pirazinamidasa (PZAsa) del *M. tuberculosis*. Se localiza en el citoplasma, se expresa de manera constitutiva y su rol fisiológico es convertir la nicotinamida en ácido nicotínico (niacina). La niacina es excretada y se acumula en el medio de cultivo porque el *M. tuberculosis* carece de una enzima para reciclarla y convertirla en nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), esta es una característica que permite distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*. En el caso de *M. bovis* la niacina no se acumula en el medio, probablemente debido a la falta de

producción de niacina por una deficiente actividad nicotinamidasasa causada por una mutación de C a G en el gen *pncA*. (13)

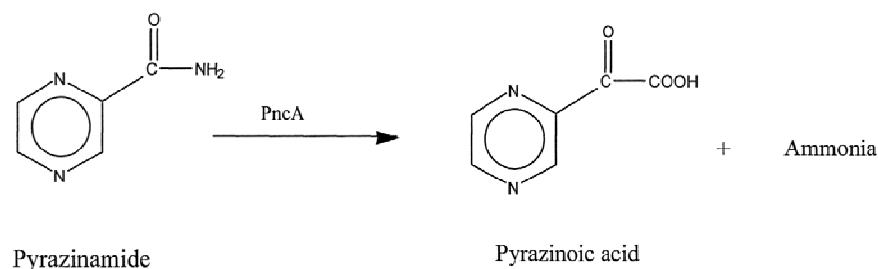


Figura 2. Conversión de la PZA a POA por la PZAsa.

Transporte de la PZA a través de la membrana celular

El mecanismo de transporte de la PZA al interior del *M. tuberculosis* es controversial. Zhang y *col* proponen que la absorción se da por difusión pasiva, mientras que Raynaud y *col* proponen que se da un transporte dependiente de ATP en competencia con la nicotinamida. No se puede excluir la posibilidad de que la PZA ingrese por ambos mecanismos. Raynaud y *col* sostienen que las cepas resistentes a la PZA también carecen de un sistema de transporte para la misma. Sin embargo, Zhang y *col* considera que las mutaciones en el gen *pncA* son suficientes para causar la resistencia y que mutaciones en el sistema de transporte son innecesarias. (13).

Modelo sobre el mecanismo de acción

La PZA como prodroga ingresa al *M. tuberculosis* por difusión pasiva y es convertida a POA (pKa=2.9) por la PZAsa. El POA sale de la célula por difusión pasiva y por una bomba de eflujo que es débil en esta bacteria. Si el pH extracelular es ácido (por Ej. 5.5) una pequeña proporción del POA tomará una forma ácida conjugada sin carga (HPOA), este POA protonado atraviesa fácilmente la membrana celular (Figura 3). Esta teoría del reingreso de HPOA al *M. tuberculosis* explica de la mejor manera el rol del pH ácido en la actividad de la PZA y está basada en las siguientes observaciones:

- 1) Cuando se adiciona ¹⁴C-PZA al cultivo de *M. tuberculosis*, el POA es localizado fuera de las células, en el sobrenadante del cultivo.
- 2) El POA se acumula en el interior de las células a pH ácido pero no a pH neutro.

3) *M. tuberculosis* resistente a PZA; sin actividad PZAsa, no absorbe PZA, pero absorbe POA a pH ácido.

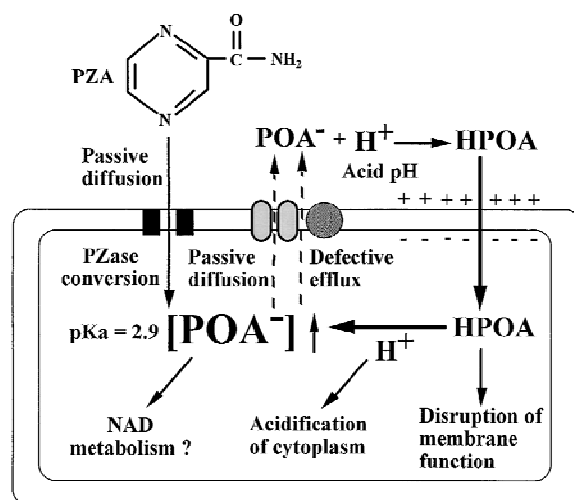


Figura 3. Modelo sobre el mecanismo de acción de la PZA en *M. tuberculosis*

El influjo de POA es aparentemente más efectivo que el débil eflujo de POA y debido a eso el POA se acumula en las células. El HPOA llevaría los protones al interior de la célula, lo cual acidificaría el citoplasma y causaría inhibición de enzimas vitales, además podría disminuir el potencial de la membrana al colapsar la fuerza protón motriz afectando el transporte celular. A pH alcalino o neutro se encuentra poco POA en *M. tuberculosis* porque el 99.9% se encontraría en forma de anión, el cual no ingresa fácilmente a las células (15). Esto explicaría porqué la PZA es activa a pH ácido y la correlación que existe entre la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de PZA y el pH. Esta inespecificidad en la acción de la PZA ayudaría a entender su gran actividad en contra de bacilos en fase estacionaria de caída y en estado no replicativo, ya que las drogas que se unen a sitios específicos interrumpen vías metabólicas importantes y son siempre más activas en bacilos en estado de replicación (13). Teniendo en cuenta los resultados hasta la fecha, no se favorece un blanco determinado para el POA en *M. tuberculosis*, pero tampoco se puede descartar (7, 13).

1.1.4 Actividad *in vitro*

La PZA sólo es activa en contra de los organismos que forman parte del complejo *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. microti*, pero no en contra de *M. bovis*. El MIC de la PZA para *M. tuberculosis* se ha reportado en el rango de 6.25 a

50.00 µg/ml a pH 5.5, mientras que bacterias no tuberculosas como *E. coli* o *M. smegmatis* son resistentes a por lo menos 2000 µg/ml de PZA a pH 5.5. Usando el medio BACTEC 7H12B a pH 5.6 se encontró que la máxima concentración de 1000 µg/ml de PZA utilizada en la prueba eliminó el 72% de la población bacteriana, esta concentración es por lo menos 20 veces el MIC (50 µg/ml) y la concentración pico alcanzada en suero (30-60 µg/ml) (13).

Entre los factores que afectan la actividad de la PZA *in vitro* se encuentran el pH, el tamaño del inóculo, la concentración de albúmina bovina sérica, la fase de crecimiento y el estatus metabólico (13).

I.1.5 Actividad *in vivo*

M. tuberculosis en macrófagos

Hay varios estudios que han determinado la capacidad de la PZA para eliminar al *M. tuberculosis* intracelular. Dependiendo de la concentración de la droga, el donante de macrófagos y el tiempo de exposición frente a los macrófagos infectados, la PZA puede ser bacteriostática o bactericida. Cabe mencionar que en estos estudios la vitamina D3 incrementó la actividad de la PZA. La vitamina D3 no tiene un efecto directo contra el *M. tuberculosis* y tampoco sinergiza con la PZA en ausencia de macrófagos. El incremento del efecto se debería principalmente a la activación de los macrófagos, produciendo un ambiente más ácido en las vacuolas. Por el contrario, cuando se adiciona POA a los cultivos de macrófagos, éste no presenta actividad en contra del *M. tuberculosis* intracelular, probablemente porque el POA como anión a pH neutro no puede ingresar a los macrófagos. Algunos estudios han reportado que la PZA no es activa frente a los bacilos intracelulares, pero en estos estudios es más probable que por detalles de técnica el pH de las vacuolas infectadas no haya sido lo suficientemente bajo para que la PZA alcance su máxima actividad (13).

Modelos Animales

La PZA tiene una actividad lenta pero prolongada en ratones, pero poca o ninguna actividad en cobayos. La razón de este efecto es desconocida. En ratones, la PZA casi no tiene efecto los primeros dos días de tratamiento, pero luego va eliminando lentamente los bacilos, su efecto bactericida continua cuando el efecto de otros

esquemas terapéuticos va decreciendo. Este efecto bactericida lento, pero persistente puede ser explicado por su gran actividad en contra de los organismos no replicativos que en aquellos que se multiplican activamente. Estos experimentos incentivaron la incorporación de la PZA en los tratamientos de corta duración. Si se usa POA en lugar de PZA, éste no presenta actividad alguna en contra del *M. tuberculosis*, probablemente debido a su pobre absorción en el tracto gastrointestinal o a una unión significativa a las proteínas del suero (13).

I.1.6 Actividad en humanos

La concentración pico de la PZA fluctúa entre 34-68 µg/ml y tiene una vida media de 6 horas. Cuando se determina el efecto de la droga, a través del recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), a partir de muestras de esputo, se observa que la PZA presenta muy poco o ningún efecto en los 2 primeros días de tratamiento, pero en los siguientes 12 días hay una caída marcada en el número de UFCs comparable al efecto de otras drogas antituberculosas. Se ha descrito que la actividad esterilizante de la PZA es evidente entre los días 15 y 56 del tratamiento debido a la reducción en el número de UFCs (13).

Estudios clínicos en África y en otros países demostraron que la PZA era tan efectiva como la RIF, además de que existía sinergia entre ambas drogas cuando se usaban en el mismo esquema terapéutico, lo que permitió reducir el tratamiento a 6 meses. Posteriormente se demostró que la PZA sólo tiene efecto esterilizante los primeros 2 meses de la terapia, debido posiblemente a que la inflamación que genera un ambiente ácido en las lesiones disminuye después de 2 meses (13).

Los esquemas terapéuticos actuales dependen de la acción de la INH, RIF y PZA como las principales drogas esterilizantes que eliminan los bacilos residuales y persistentes luego de la gran actividad inicial bactericida de la INH. La administración de la PZA luego de los 2 primeros meses de tratamiento no es recomendable, aunque podría jugar un pequeño rol en la prevención de los fracasos.

I.2 Resistencia a PZA

Los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a PZA usualmente son deficientes en la actividad PZAsa. Existe una buena correlación entre la resistencia a

PZA y la pérdida de la actividad enzimática (9). Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA carecen de ambas actividades; pirazinamidasa y nicotinamidasa, y también presentan resistencia a nicotinamida, pero no a otras drogas antituberculosas. Esto sugiere que la actividad antituberculosa de la PZA y la nicotinamida está en la enzima nicotinamidasa/pirazinamidasa (13).

Al estudiar la base genética de la resistencia a PZA, se identificó el gen *pncA* de la PZAsa en el *M. tuberculosis*, se demostró que la transformación de *M. bovis* BCG resistente a PZA con el gen *pncA* del *M. tuberculosis* le confirió actividad PZAsa y susceptibilidad a la PZA. Además se demostró que las mutaciones en el gen *pncA* son el mayor mecanismo de resistencia a PZA (2, 4, 8, 9, 10, 16, 17, 18). Las diferencias en la frecuencia de las mutaciones en el gen *pncA* de 72 a 98 %, de cepas resistentes a PZA, pueden reflejar en parte la incorrecta determinación de la susceptibilidad a PZA, un problema común con las pruebas de susceptibilidad actuales, y por otra parte implica otros genes involucrados en la resistencia a PZA (2, 4, 8, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22).

Las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* resistentes a PZA son sensibles a POA, lo que indica que la resistencia es causada por cambios en la actividad PZAsa debido a mutaciones en el gen *pncA* o en casos raros a mutaciones en los genes reguladores del *pncA*. No se han aislado mutantes resistentes a POA (2).

Las mutaciones identificadas en el gen *pncA*, son en su mayoría sustituciones que originan mutaciones con sentido o cambio de aminoácido, inserciones y deleciones que pueden cambiar o no el marco de lectura y en escasas ocasiones mutaciones sin sentido o terminadoras. También se han identificado algunas mutaciones en la región promotora del gen (8, 22). Es interesante notar que las mutaciones son muy diversas y se encuentran dispersas a lo largo del gen. Sin embargo, son más frecuentes las mutaciones que ocurren alrededor del sitio activo (Asp8, Lys96 y Cys138) o del sitio de unión a metales (Asp49, His51, His57 e His71) (23). Otras mutaciones ocurren en posiciones aminoacídicas que se alinean con el sitio activo, por lo tanto son propensas a causar pérdida de la actividad, algunas impiden la formación de puentes de hidrógeno o alterarían el núcleo de la proteína (13). Esta alta diversidad de mutaciones en el gen *pncA* es particular de la resistencia a PZA, la base de este

fenómeno es incierta, es probable que por ser la PZAsa una enzima no esencial no exista una presión selectiva sobre el tipo de mutación, de ese modo, todo tipo de mutaciones serían toleradas. Consistente con esta hipótesis, las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA son completamente virulentas y capaces de ser transmitidas (13).

Existe una pequeña proporción de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, que no presentan mutaciones en el gen *pncA* o en su región promotora. Un grupo de estas cepas son PZAsa negativa, lo que sugiere la presencia de otras mutaciones en las regiones reguladoras del gen. Otro grupo de cepas presenta actividad PZAsa, lo que sugiere un mecanismo alternativo de resistencia a PZA, estas cepas son raras y presentan un bajo nivel de resistencia (MIC de 200 µg/ml en el BACTEC). Hay que tener cuidado a la hora de categorizar una cepa con bajo nivel de resistencia y analizar las siguientes posibilidades: 1) ser falso resistente. Se debe repetir la determinación del MIC. 2) Contaminación con otra bacteria (no micobacteria) naturalmente resistente a PZA. 3) Población mixta. Presencia de una proporción significativa de clones resistentes a PZA en una población de bacilos sensibles (13).

Mientras la resistencia adquirida a PZA en *M. tuberculosis* ocurre por mutaciones en el gen *pncA*, el mecanismo de la resistencia natural en otras micobacterias es más complejo. Las cepas de *M. bovis* incluyendo el BCG son naturalmente resistentes a PZA debido a una mutación puntual (C→G) en la posición 169 del gen, causando la sustitución de histidina 57 por ácido aspártico en *M. tuberculosis*. *M. kansasii* es también resistente presenta un MIC de 250 µg/ml en el BACTEC debido a la actividad PZAsa débil. *M. smegmatis* es altamente resistente a PZA (MIC > 2000 µg/ml) a pH 5.5, esto se debe a que tiene el eflujo más eficiente del POA que en *M. tuberculosis*. *M. avium* tiene una alta actividad PZAsa, pero su resistencia natural también se debería a su mecanismo de eflujo del POA. Este mecanismo de eflujo es probablemente la causa de la resistencia intrínseca en otras especies bacterianas. La bomba de eflujo encargada de la expulsión del POA en *Mycobacterium* todavía no ha sido identificada (13).

I.3 Pruebas de susceptibilidad a PZA

Las dificultades de la determinación de la susceptibilidad a PZA son muy conocidas y surgen por dos razones: 1) La acidez del medio requerido para la actividad de la droga inhibe el crecimiento del *M. tuberculosis*. 2) El uso de un inóculo muy grande conlleva al incremento de amonio en el medio, lo que eleva el pH inactivando a la PZA.

I.3.1 Pruebas basadas en el cultivo

Como ya se mencionó, la poca capacidad tampón del medio, el uso de un pH muy cercano al punto de inhibición del crecimiento y el uso de inóculos muy grandes son las principales dificultades de estas pruebas. Además, el método de las proporciones usado convencionalmente tiene un procedimiento tedioso y puede ser difícil de leer, el tiempo que toma hasta obtener resultados es de 3 a 4 semanas luego de aislar la bacteria (7, 13).

Stottmeier desarrolló un método de susceptibilidad en el cual se hace crecer el *M. tuberculosis* en agar 7H10 con pH ajustado a 5.5 y 100 µg/ml de PZA. La resistencia es definida como un crecimiento de más del 1 % en el medio que contiene la droga comparado con el medio sin droga (control). Se encontró que el 20 % de las cepas no crecieron satisfactoriamente cuando se les cultivó en el medio ácido (24). Este es el método menos confiable habiendo varios reportes de falsa resistencia (4, 13).

El medio sólido Löwenstein Jensen que contiene huevo usado en el método de proporciones tiene una mejor capacidad tampón que los agares 7H10/11 que contienen ácido oleico y que el caldo 7H9 y ha sido usado como soporte en ensayos clínicos con buenos resultados. Sin embargo, la búsqueda de pruebas más precisas depende del uso de un pH levemente más alcalino, que permita el crecimiento de todas las cepas a ser estudiadas y al mismo tiempo mantenga la actividad de la PZA. Esta modificación solo ha sido explorada en el método BACTEC, que usa un medio líquido y es actualmente el más confiable (13).

BACTEC™-460TB

Es un método radiométrico desarrollado por la compañía Becton Dickinson. Se basa en la medición del $^{14}\text{CO}_2$ producido por el rompimiento del ácido palmítico ($1\text{-}^{14}\text{C}$) debido al metabolismo de la micobacteria (25). Para la determinación de la susceptibilidad a PZA el medio 7H12B usado tiene pH 6, a este pH se puede determinar la actividad de la PZA sin inhibir el crecimiento de la mayoría de aislamientos de *M. tuberculosis*. Para compensar el incremento del pH, una concentración mayor de 100 $\mu\text{g/ml}$ PZA debe ser usada, a diferencia de las pruebas convencionales que usan de 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ (26).

El MIC de PZA a 100 $\mu\text{g/ml}$ que se encuentra por encima de la concentración pico alcanzada en suero, es generalmente satisfactorio, pero todavía se identifican falsos resistentes. En vista de esto, Heifets propuso una concentración de 300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PZA como MIC. Zhang y *col* calcularon el MIC teórico de PZA a pH 6 usando la ecuación de Henderson-Hasselbach, dado que la PZA es totalmente convertida a POA, el MIC fue de 156 $\mu\text{g/ml}$. De este modo sugirió que 200 $\mu\text{g/ml}$ podría ser considerado como MIC ya que está comprendido entre 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$, aunque de ser aceptado debe ser probado vigorosamente (13).

La interpretación de las lecturas se realiza cuando el Índice de Crecimiento (GI) del tubo control (no contiene PZA) llega a 200. Si no se obtiene un GI de 200 en un plazo de 20 días, los resultados se consideran no interpretables (27).

El estearato de polioxietileno (POES) se usa como aditivo para incrementar el crecimiento del *M. tuberculosis*, usualmente es incluido en el medio 7H12B, pero se ha encontrado que a pH 6 es tóxico e inhibe el crecimiento de una pequeña fracción de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (13).

Aunque la introducción del BACTEC ha mejorado la determinación de susceptibilidad a PZA además de reducir el tiempo en la obtención de resultados, aún depende del lento crecimiento del *M. tuberculosis*, lo que puede llevar de 1 a 2 semanas (28).

MGIT™ 960

Es un método fluorométrico desarrollado por la compañía Becton Dickinson. Las siglas derivan de Mycobacterial Growth Indicator Tube o Tubo Indicador del Crecimiento Micobacteriano. Se emplea como un método alternativo no radiométrico para detectar la susceptibilidad a drogas en *M. tuberculosis* (29).

El medio contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado y posee un compuesto fluorescente embebido en silicona en la parte inferior del tubo, el compuesto fluorescente es sensible al oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial de oxígeno disuelto inhibe las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Los microorganismos al respirar consumen el oxígeno disuelto en el medio lo que permite observar la fluorescencia que es proporcional al número de bacterias presentes. La fluorescencia se puede detectar manualmente con una lámpara de Wood a 365 nm de luz UV (30). En el caso de la PZA el caldo tiene una concentración de 100 µg/ml de la droga y un pH de 5.9. En estudios de comparación se encontró una concordancia del 96.6% con el BACTEC™-460TB (29).

MB/BACT

Es un método colorimétrico desarrollado por Organon Teknika (Holanda) que detecta la producción de CO₂ en el medio. En un estudio de evaluación multicentro se demostró que su sensibilidad y especificidad para determinar la susceptibilidad a PZA fue del 100 % comparado con el BACTEC™-460TB (31).

Los métodos BACTEC y MGIT han sido adoptados en muchos laboratorios de los países desarrollados. Se basan en la detección automática del crecimiento micobacteriano en medio líquido en presencia de drogas y por lo tanto son más rápidos que los métodos basados en la detección visual del crecimiento en medio sólido. Sin embargo, una desventaja de estos sistemas es el no poder verificar la morfología de las colonias en los cultivos. Además, la contaminación no visible y el sobrecrecimiento de micobacterias atípicas afectan la confiabilidad de las pruebas. Otra desventaja es que incluyen múltiples tubos o botellas que están restringidos a discriminar entre resistencia y susceptibilidad, más que a determinar los MICs exactos de las drogas. Aunque en la rutina diaria las pruebas de susceptibilidad en medio

líquido automatizadas parecen ser las más eficientes, los altos costos y la ausencia de recursos humanos adecuadamente entrenados restringen su implementación a nivel mundial (32).

I.3.2 Pruebas basadas en la actividad enzimática

Debido a la buena correlación entre la pérdida de la actividad PZAsa y la resistencia a PZA, la determinación de la actividad PZAsa sirve como una medida indirecta de la susceptibilidad a PZA (24). Existen 3 tipos de ensayos: los métodos de Wayne, Russell y McClatchy. Estos métodos obvian la dificultad de crecer la micobacteria a pH ácido, como es requerido en las pruebas convencionales de susceptibilidad (13).

Método de Wayne

Se basa en la detección del POA, el cual forma un compuesto de color rosado a rojizo cuando reacciona con el sulfato ferroso de amonio (33). En esta prueba, varias asadas de cultivo fresco de *M. tuberculosis* son sembradas en la superficie del agar Dubos suplementado con piruvato sódico que contiene 100 µg/ml de PZA y se encuentra dispensado en tubos. Luego de 4 y 7 días de incubación a 37 °C se examina la presencia de POA adicionando sulfato ferroso de amonio, la presencia de un anillo rosado en el tubo indica actividad pirazinamidasasa (24, 33). El método de Wayne requiere de grandes inóculos de bacteria, de otra manera se incrementa el riesgo de falsos-negativos (24).

Método de Russell

Se basa en la detección de amonio, el cual reacciona con el fenol-hipoclorito para formar un compuesto de color azul (13).

Método de McClatchy

Se basa en la detección de POA por cromatografía en capa fina (CCF). Las bacterias son cultivadas en caldo 7H11 que contiene 100 µg/ml de PZA. Son centrifugadas y 5 µl del sobrenadante es sembrado en láminas de silicagel. La PZA y el POA tienen diferentes mobilities usando el sistema solvente isopropanol/hidróxido de amonio 2N (70:30) por 7 horas. La PZA y el POA son visualizados con luz UV. Los R_f de la PZA y el POA son 0.95 y 0.65 respectivamente. Comparado con el test de Wayne, la CCF demostró ser algo más sensible en la detección de POA. A pesar de ello, en

1981, McClatchy recomendó el uso del test de Wayne como método cualitativo para la determinación de la resistencia a PZA en *M. tuberculosis* debido a su facilidad en la realización (24).

Mientras que la medida de la actividad PZAsa es un buen indicador de la resistencia a PZA, los resultados de la prueba convencional de Wayne, la más usada no han sido aceptados en la determinación de susceptibilidad a PZA debido en gran parte a su sensibilidad, lo que puede originar resultados falsos-resistentes. A pesar de ello la prueba de la PZAsa es realizada de manera frecuente y en paralelo con la determinación de susceptibilidad a PZA como medida independiente de la susceptibilidad (13).

I.3.3 Pruebas moleculares

Debido a que las mutaciones ocurren en hasta un 98% de cepas resistentes a PZA, es posible aplicar o desarrollar un método molecular para la detección rápida de la resistencia a PZA (2, 8). La detección de las mutaciones en el gen *pncA* tiene la ventaja de obviar los problemas de las pruebas basadas en el fenotipo a pH ácido. Sin embargo, un gran reto para las pruebas moleculares es que las mutaciones del *pncA* son muy diversas y se encuentran dispersas a lo largo del gen *pncA* que mide 561 pares de bases. Hasta la fecha el método de identificación de mutaciones más exacto es el secuenciamiento (13). En los últimos años se han aplicado algunos métodos para detectar la presencia de mutaciones en el *pncA*, su eficiencia ha sido variable. Entre ellos tenemos:

SSCP

Es una de las técnicas basadas en el PCR para detectar mutaciones, es quizás la más fácil y sensible. El método original requería de radioactividad, pero luego se desarrollaron métodos no radioactivos. Este método ha sido usado ampliamente para la detección de mutaciones en genes responsables de varias enfermedades hereditarias, mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumor y también ha servido para detectar los polimorfismos de diferentes genes y de marcadores de locus en el genoma humano (34).

La movilidad del ADN de doble hebra en la electroforesis en gel es relativamente independiente de la secuencia nucleotídica. Por el contrario, la movilidad del ADN de hebra simple puede variar considerablemente como resultado de pequeños cambios en la secuencia nucleotídica. Este hecho llevó al desarrollo de las técnicas del Polimorfismo Conformacional de Hebra Simple (35). El principio consiste en detectar mutaciones por los cambios de movilidad de la hebra simple de ADN en la electroforesis con geles de poliacrilamida. Luego de amplificar la secuencia de interés, el producto amplificado es desnaturalizado, obteniéndose así las hebras simples de ADN que serán sujetas a electroforesis. Las bandas de las hebras simples de ADN pueden ser visualizadas con coloración de plata o teñidas con bromuro de etidio. Bandas a diferentes posiciones en el gel indican la presencia de mutaciones. La movilidad de la hebra simple del ADN es dependiente de la secuencia debido a variados grados de enlaces intra-cadena entre las bases que resultan en un plegamiento característico (34).

La sensibilidad del SSCP depende de como la mutación afecta el plegamiento y éste afecta la movilidad electroforética de la secuencia problema. Por lo tanto algunas mutaciones no pueden ser detectadas bajo ciertas condiciones de electroforesis (34). Scorpio y *col* y Davies y *col* intentaron usar el SSCP para la detección de mutaciones en el gen *pncA*, pero los resultados de sensibilidad que obtuvieron no fueron los ideales, además de que solo trabajaron con unas pocas muestras y las condiciones usadas en ambas electroforesis fueron diferentes (2, 36).

DGGE

La electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE) es una técnica capaz de detectar mutaciones en regiones largas del ADN (37). Con el DGGE las mutaciones dentro de un amplicón son reconocidas como alteraciones en la temperatura de fusión mientras el fragmento migra a través de un gradiente desnaturalizante. Los cebadores empleados contienen regiones ricas en GC en el extremo 5' que sirven como el dominio de punto de fusión más alto y como uniones "clamps" que previenen que los fragmentos de ADN se desnaturalicen por completo. Al ser el dominio con más alto punto de fusión permite la detección de mutaciones en el resto de la secuencia problema y así se incrementa su sensibilidad. Las alteraciones mutacionales resultan en bandas que migran diferente de la secuencia salvaje (37).

Para realizar esta técnica se requiere de un equipo de electroforesis especial que permita mantener temperaturas altas, además de adicionar 40 nucleótidos de GCs en el extremo 5' de uno de los cebadores (34).

McCammon y *col* realizaron un estudio para detectar las mutaciones resistentes a PZA en el gen *pncA*. Con el análisis de 5 fragmentos de PCR se logró una sensibilidad y especificidad del 98% (37).

Microarreglos de ADN

La técnicas de microarreglos de ADN tienen el potencial de mejorar y simplificar la detección de mutaciones en genes virales y bacterianos, pero una amplia aplicación de esta tecnología se ve restringida por el alto costo de los ensayos (28). Zhang y *col* desarrollaron un método basado en microarreglos de ADN para la detección de *M. tuberculosis* resistente a PZA. Trabajaron con 19 cepas confirmadas resistentes a PZA y lograron identificar todas las mutaciones presentes en estas cepas (28).

Secuenciamiento de ADN

Hasta la fecha es el método más efectivo para la identificación de mutaciones en el gen *pncA*.

Otras pruebas han sido descritas para detectar la susceptibilidad a PZA, entre ellas se encuentran; el Ensayo Simple basado en Fibroblasto (SFA), la citometría de flujo, y el HPLC, pero su empleo en un mayor número de muestras y su posible aplicación en países de escasos recursos necesita ser evaluado (38, 39, 40).

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Materiales y Equipos

Cepas control

Para las diferentes pruebas se trabajó con las cepas salvajes *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* ATCC 27289. H37Rv sensible a PZA y *M. bovis* resistente a PZA.

Microbiología

- Placas petri
- Asas de siembra
- Matraces
- Tubos de vidrio con tapa rosca, 16 X 125 mm
- Mechero
- Jarra para descarte
- Autoclave
- Incubadora
- Cabina de Flujo Laminar

BACTEC™-460TB

- BDBACTEC™ PZA Test Medium Culture Vials
- BACTEC™ Pyrazinamide (PZA) Drug Kit
- BD BACTEC™-460TB system

Biología Molecular

- Tubos de microcentrífuga de 2 ml con tapa rosca
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tubos de PCR, 0.2 µl
- Gradillas
- Micropipetas p1000, p200 y p20
- Puntas de 1000, 200 y 10 µl
- Puntas largas de 200 µl
- Matraz de 250 ml

- Vórtex
- Calentador en bloque
- Baño María
- Microcentrífuga
- Cámara de electroforesis vertical
- Termociclador
- Bandeja de tinción
- Transiluminador UV
- Cámara de Electroforesis vertical para geles de 16 x 20 cm

II.2 Lugar de ejecución de la tesis

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

II.3 Métodos

Las pruebas realizadas se pueden apreciar en la figura 4.

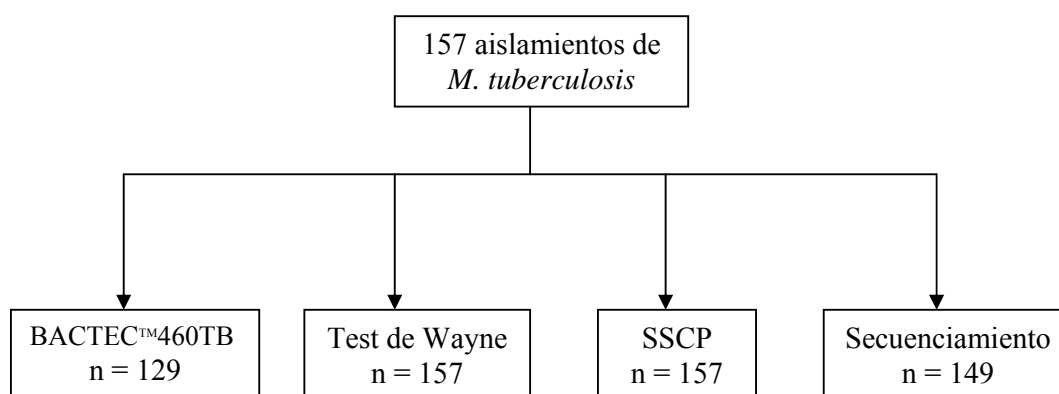


Figura 4. Diagrama de los pruebas usadas en el estudio.

II.3.1 Aislamientos clínicos

Se trabajó con 157 cepas de *M. tuberculosis* incluyendo 49 cepas de pacientes VIH positivo, provenientes del Área de Mycobacterium del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para incrementar el número de cepas resistentes a PZA se seleccionaron algunas cepas con sospecha de multidrogoresistencia. Las cepas fueron entregadas de manera anónima. Todas las manipulaciones de cepas de *M. tuberculosis* fueron realizadas en un ambiente con nivel de bioseguridad 3. El BACTEC™460TB y el secuenciamiento no se realizaron en todas las cepas debido a los altos costos de las pruebas.

II.3.2 Susceptibilidad a drogas de primera línea

Se determinó la susceptibilidad a otras drogas de primera línea como RIF, INH, SM y EMB, usando el método en Microplaca con Azul de Alamar (MABA) (42). Las cepas fueron procesadas por el personal del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas.

II.3.3 Pruebas de Susceptibilidad a PZA

II.3.3.1 BACTEC™-460TB

La prueba comercial BACTEC™-460TB fue empleada para determinar la susceptibilidad a PZA en las cepas de *M. tuberculosis*. La prueba fue realizada en los laboratorios del Instituto Nacional de Salud (INS) por personal del mismo y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

II.3.3.2 Test de Wayne

La determinación de la actividad de la PZAsa se llevó a cabo según Wayne (33). Las cepas de *M. tuberculosis* fueron cosechadas luego de 2 a 3 semanas de crecimiento. Se sembró de 1 a 2 asadas de cultivo en 2 tubos de agar Dubos suplementado con PZA y se incubaron a 37 °C. Un tubo fue leído al cuarto día y el otro al séptimo día. Para la lectura se adicionó 1 ml de sulfato ferroso de amonio al 1% preparado en el momento y se dejaron los tubos a temperatura ambiente por 30 min (33). Luego se observó por la presencia de un anillo rosado o rojizo en la interfase del tubo que indica actividad PZAsa positiva o conversión de PZA a POA, la ausencia del anillo o coloración indica actividad PZAsa negativa (7, 33, 36). Las cepas control fueron *M.*

tuberculosis H37Rv (positivo/sensible) y *M. bovis* ATCC 27289 (negativo/resistente). El control de color contiene POA en lugar de PZA y como control de medio se usa un tubo de agar libre de cultivo. (33)

II.3.3.3 SSCP

Para realizar esta prueba primero se extrajo el ADN de las cepas de *M. tuberculosis*. Se procedió de la siguiente manera: Se cosechó una asada de cultivo en 500 µl de buffer TE. Las bacterias fueron inactivadas a 80°C por 20 min. Se agregó 50 µl de lisozima (10 mg/ml), se vortexeó y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se agregó 50 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteínaasa K (20 mg/ml), se incubó a 65°C por 1 h, homogenizando cada 20 min. Se agregó 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB/NaCl previamente calentado a 65°C, se incubó a 65°C por 10 min. Seguidamente se adicionó 750 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se vortexeó y centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue separado a otro tubo. Se adicionó 750 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se procedió como en el paso anterior. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se congeló a -70°C por 15 min. Luego se centrifugó a 13,000 rpm por 8 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% frío, se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Se disolvió el ADN en 100 µl de buffer TE incubando a 55°C por 15 min (43). La concentración de ADN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% usando ADN del fago Lambda como referencia.

Para la amplificación del gen *pncA* se usaron los cebadores P7 (5'-TGCGGGCGTTGATCATC) y P8 (5'-CAGGAGCTGCAAACCAACTC) (36). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, conteniendo 0.2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 1 µM de cada primer, de *Taq* polimerasa 0.5 U, ADN 10 ng y MgCl₂ 1.5 mM, buffer KCl. Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 1 min, terminando con una extensión de 72°C por 5 min. El producto obtenido fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El producto obtenido fue de 559 pares de bases.

Para el SSCP, con modificaciones sobre protocolos previos (2, 36), el procedimiento

fue el siguiente: el producto amplificado fue denaturado a 98°C por 10 min en buffer formamida (1:1) y enfriado en hielo por 10 min. (2). Seguidamente se realizó una electroforesis vertical, se cargó 40 µl de la mezcla en un gel MDE 0.8X (16 x 20 cm) en buffer TBE 0.6X. Se mantuvo un poder constante de 3 Watts, una temperatura de 12°C y una duración de 20 horas. Luego el gel MDE fue teñido con bromuro de etidio por 10 min, se enjuagó con agua destilada por 5 min y se usó un transiluminador UV para visualizar las bandas de ADN. Las cepas de referencia fueron: *M. tuberculosis* H37Rv (*pncA* salvaje), y *M. Bovis* ATCC 27289 (mutación única C169G). Las cepas de referencia se incluyeron en cada corrida electroforética.

La interpretación del SSCP consiste en comparar los patrones de migración de las bandas de hebra simple de la cepa de referencia sensible con las cepas problema. Cualquier patrón diferente al de la cepa de referencia sensible se considera como resistente. Las lecturas se realizaron en ciego.

II.3.4.4 Secuenciamiento

El gen *pncA* fue secuenciado desde la región promotora luego de ser amplificado con los cebadores P1 (5'-GTCGGTCATGTTCGCGATCG) y P6 (5'-GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA) (2). El tamaño del producto fue de 720 pares de bases. Los productos de amplificación fueron purificados directamente del gel de agarosa usando el kit QIAEX II de QIAGEN. Los productos purificados fueron enviados al Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, Universidad Peruana Cayetano Heredia para su secuenciamiento en un equipo ABI 3100. El análisis de la secuencias de ADN se realizó comparando las secuencias obtenidas con la secuencia del gen *pncA* de *M. tuberculosis* H37Rv.

III. RESULTADOS

Susceptibilidad a drogas de Primera Línea

Se obtuvieron los resultados de susceptibilidad a INH, RIF, SM y EMB de 135 cepas. El 54% (73/135 cepas) fue multidrogo-resistente. La Resistencia a INH, RIF, SM y EMB fue de 64.4%, 59.3%, 40.7% y 16.3% respectivamente. El 75.5% (37/49) de las cepas provenientes de pacientes VIH positivos presentó multidrogo-resistencia.

Susceptibilidad a PZA

BACTEC™-460TB

La prueba comercial BACTEC™-460TB fue considerada como el método de referencia para determinar la susceptibilidad a PZA (13). Se determinó la susceptibilidad de 129 cepas. El 62% (81 cepas) fue resistente a PZA. El 86.6% (58/67) de cepas MDR fueron también resistentes a PZA. La resistencia combinada a PZA y alguna de las otras drogas de primera línea fue de 56.3, 54.5, 56.5 y 16.0% para INH, RIF, SM y EMB respectivamente.

Tomando en cuenta la presencia de resistencia a alguna de las drogas de primera línea la probabilidad de presentar resistencia a PZA fue de 0.80, 0.84, 0.84 y 0.94 para INH, RIF, SM y EMB respectivamente. Por otro lado, considerando la presencia de resistencia a PZA la probabilidad de presentar resistencia a alguna de las otras drogas fue de 0.91, 0.88, 0.56 y 0.26 para INH, RIF, SM y EMB respectivamente.

Entre los pacientes VIH positivos, el 68.8% (33/48) de las cepas presentó resistencia a PZA. Además el 65.2% (30/46) de las cepas fueron MDR incluyendo la PZA.

Test de Wayne

Se determinó la actividad de la PZAsa en 157 cepas. El 49.7% (78 cepas) fue resistente a PZA con actividad PZAsa negativa. El 80% (59/73) de cepas MDR analizadas fueron resistentes a PZA. El Test de Wayne presentó una especificidad del 95.9% y una sensibilidad del 91.4% teniendo al BACTEC™-460TB como referencia.

SSCP

Las modificaciones realizadas al protocolo del SSCP (2, 36), permitieron su utilización en la determinación de la resistencia a PZA relacionada a mutaciones en el gen *pncA*. Las condiciones de temperatura, tiempo de corrida y tipo de gel fueron las principales modificaciones realizadas. La prueba tomó 3 días desde la extracción de ADN hasta la interpretación de los resultados. Se analizó el patrón de migración de 157 cepas, el 45.8% (72 cepas) fue resistente a PZA, es decir, presentaron un patrón de bandas diferente al del control sensible.

El Patrón de bandas del control sensible *M. tuberculosis* H37Rv consistió de 3 bandas; dos superiores y una inferior. La cepa *M. bovis* naturalmente resistente a PZA tuvo un patrón de 2 bandas. La determinación de la susceptibilidad a PZA de acuerdo a los patrones de migración se puede apreciar en las figura 5.

Se detectó resistencia a PZA en el 87.9% (29/33) de casos VIH infectados con *M. tuberculosis* resistente a PZA.

El SSCP presentó una especificidad del 98.0% y una sensibilidad del 85.0% teniendo al BACTEC™-460TB como referencia.

Secuenciamiento del gen *pncA*

Se enviaron a secuenciar muestras de ADN provenientes de 149 cepas. De las 149 secuencias obtenidas, 77 (51.7%) presentaron mutaciones a lo largo del gen *pncA*. Dentro de las 77 secuencias se encontraron 31 mutaciones diferentes (sustituciones, inserciones y deleciones), todas causales de cambio en la proteína (PZA_{sa}). De las 31 mutaciones, 16 (51.6%) mutaciones no han sido descritas previamente (2, 4, 8, 16-22, 45, 47) (Tabla 1).

Las mutaciones más frecuentes fueron G145A/D49N (27.3%) y A152G/H51R (13%). Los aminoácidos correspondientes, Asp49 e His51, son esenciales para el sitio de unión a metales de la PZA_{sa} (23).

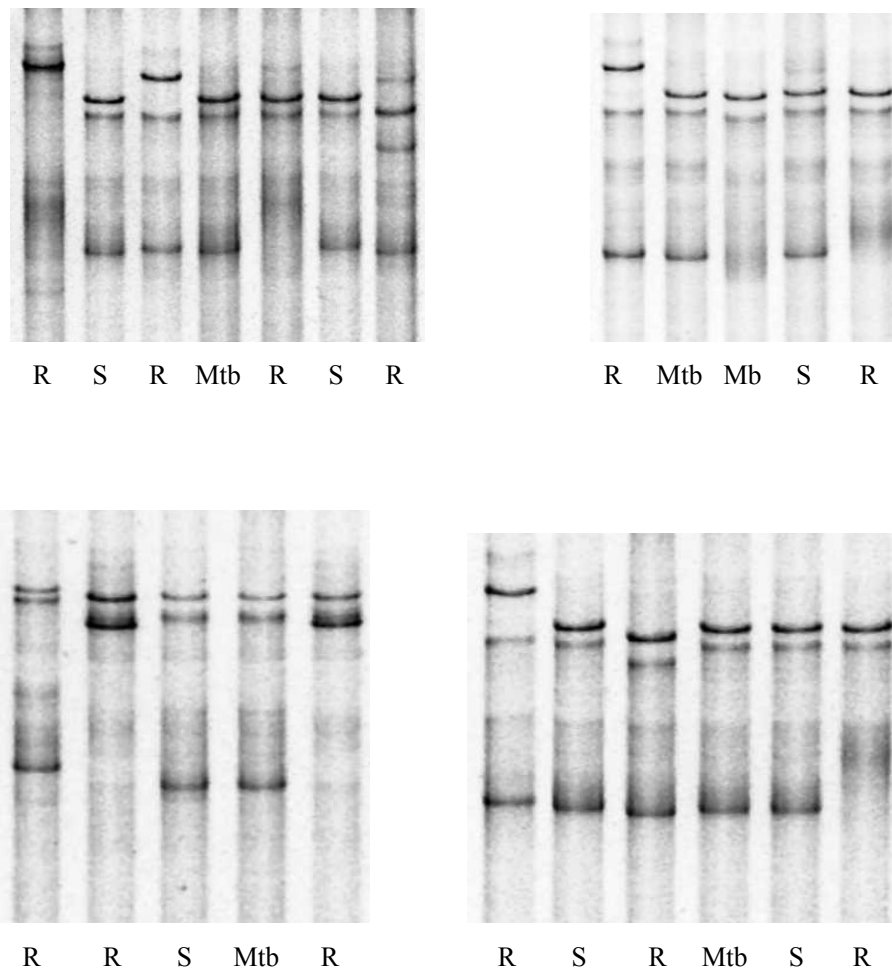


Figura 5. Patrones de migración del *pncA* en el SSCP. *M. tuberculosis* (S); Mb, *M. bovis* (R); S, Sensible; R, Resistente.

Mutación en el ADN	Cambio de aminoácido
Mutaciones conocidas	
T11C	L4C
A29G	Q10R
A35C	D12A
T40G	C14G
C123A	Y41stop
A152G	H51R
C161T	P54L
ins GG@188	cambio del marco de lectura
C211T	H71Y
A226C	T76P
T254C	L85P
C309G	Y103stop
C364T	Q122stop
A403C	T135P
A410C	H137P
Mutaciones nuevas	
A36G	D12G
A143C	K48T
G145A	D49N
C185T	P62L
ins T@251	cambio del marco de lectura
ins 18pb@258	ins 6aa
ins 106pb@279	ins 35aa
T280C	F94L
del CA@285	cambio del marco de lectura
del 10bp@293	del 3aa
G314A	G105D
T347C	L116P
G356T	W119L
del 81pb@359	del 27aa
ins GA@377	cambio del marco de lectura
del T@490	cambio del marco de lectura

Tabla 1. Mutaciones encontradas en el gen *pncA* de las cepas estudiadas

De las 77 secuencias que presentaron mutaciones en el gen *pncA*, 6 no pudieron ser detectadas por el SSCP. La mayoría de estas mutaciones se encuentran al inicio del gen, como se puede apreciar en la tabla 2.

mutación en el ADN	cambio de aminoácido
T11C	L4S
A29G	Q10R
A35C	D12A
A36G	D12G
T280C	F94L
ins GA@377	cambio del marco de lectura

Tabla 2. Mutaciones no detectadas por el SSCP.

El 92.6% (75 cepas) de las cepas resistentes a PZA (según el BACTEC™-460TB) presentaron mutaciones en el gen *pncA*.

El secuenciamiento presentó una especificidad del 98.0% y una sensibilidad del 92.6% teniendo al BACTEC™-460TB como referencia.

Sensibilidad y Especificidad del SSCP usando cada prueba como referencia

SSCP	BACTEC™-460TB		
	Resistente	Sensible	total
Resistente	69	1	70
Sensible	12	47	59
total	81	48	129
	Sensibilidad	Especificidad	
	85%	98%	

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del SSCP en referencia al BACTEC.

De las 12 muestras calificadas como resistentes por el BACTEC pero sensibles por el SSCP, 6 fueron sensibles por el test Wayne y además no presentaron mutaciones en el gen *pncA*.

La muestra calificada como sensible por el BACTEC pero resistente por el SSCP, fue también resistente por el test de Wayne, además de presentar una mutación en el gen *pncA*.

SSCP	Test de Wayne (PZAsa)		
	Resistente	Sensible	total
Resistente	72	0	72
Sensible	6	79	85
total	78	79	157
	Sensibilidad	Especificidad	
	92.3%	100.0%	

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad del SSCP en referencia al test de Wayne.

Los valores de sensibilidad y especificidad del SSCP se incrementaron cuando se tomó como referencia los resultados del test de Wayne que mide la actividad PZAsa.

SSCP	Secuenciamiento-pncA		
	Resistente	Sensible	total
Resistente	71	0	71
Sensible	6	72	78
total	77	72	149
	Sensibilidad	Especificidad	
	92.2 %	100.0%	

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad del SSCP en referencia al secuenciamiento.

El SSCP tuvo una especificidad del 100% con respecto al secuenciamiento del gen *pncA*, lo que indica que ningún falso-resistente fue diagnosticado.

IV. DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud en una de sus últimas publicaciones sobre TB en el 2008 describe el orden de las drogas de primera línea a ser analizadas en pruebas de susceptibilidad. Esta recomendación está basada en la relevancia clínica, así como en la confiabilidad de las pruebas de susceptibilidad disponibles. De las 5 drogas de primera línea, la PZA se encuentra en el último lugar, a pesar de su importante rol en la terapia antituberculosa (44). Esto remarca una vez más la necesidad de desarrollar pruebas de susceptibilidad para PZA que sean confiables, rápidas y de bajo costo, para ser implementadas especialmente en áreas con escasos recursos.

En el presente estudio se evaluó el uso de una prueba molecular, el SSCP, en la determinación de la susceptibilidad a PZA en cepas de *M. tuberculosis*. Esta prueba permite detectar las mutaciones presentes en el gen de la *pncA*, que es el principal mecanismo de resistencia a la droga. La sensibilidad y especificidad de esta prueba comparada con el BACTEC™-460TB fue de 85 % y 98 % respectivamente.

Dentro de las pruebas de susceptibilidad a PZA, el uso del BACTEC™-460TB como método de referencia se debió a que es una de las pruebas automatizadas basadas en el cultivo que hasta la fecha se ha comprobado su utilidad en la determinación de la resistencia a diferentes drogas incluyendo la PZA. Otras pruebas de susceptibilidad basadas en el cultivo no son confiables dado los problemas de crecimiento de las bacterias al pH ácido requerido para la actividad de la droga. Cabe mencionar que se hizo uso del único equipo BACTEC™-460TB disponible en el Perú. Esta clase de equipos son usados de manera común en los países desarrollados, ya que se requiere de un alto costo para su implementación y empleo, además de adoptar las medidas necesarias para eliminar materiales radiactivos (45).

En cuanto al tiempo para obtener resultados, el BACTEC™-460TB tardó aproximadamente 2 semanas, el test de Wayne requiere una semana; luego de que se obtiene suficiente cultivo para ser inoculado en los tubos, el secuenciamiento también tardó una semana y el SSCP 3 días. Los costos aproximados por muestra son de

40.00, 0.27, 17.10 y 1.36 dólares para el BACTEC™-460TB, test de Wayne, secuenciamiento y SSCP respectivamente; con excepción del test de Wayne, el SSCP es el más económico.

De este modo, las pruebas para determinar la resistencia a PZA demoran mucho o no se encuentran disponibles en los países de bajos recursos donde la mayor parte de la resistencia a drogas ocurre. La resistencia a PZA en el Perú es común (12), pero sin un método de detección oportuno se consigue que los pacientes sean tratados de manera inapropiada por meses con esta droga hepatotóxica. Por otro lado, no todas las cepas de *M. tuberculosis* MDR presentan resistencia a PZA, por lo que los pacientes infectados con estas cepas podrían seguir recibiendo PZA en combinación con otras drogas (11). Por lo expuesto anteriormente, el SSCP se presenta como una buena alternativa en la detección de la resistencia a PZA.

Si bien es cierto que el 85% de sensibilidad no es el ideal, hay que mencionar que dentro del 15% restante, la mitad de las muestras no presentaron mutaciones en el gen *pncA* además de ser sensibles por la prueba de Wayne, indicando mecanismos alternativos de resistencia. Es por eso que comparado con el test de Wayne la sensibilidad se incrementa al 92.3%, el 7.3% restante comprende mutaciones que no pudieron ser detectadas por el SSCP.

Por otro lado, el BACTEC™-460TB no siempre va a determinar la correcta susceptibilidad, como ya se ha mencionado previamente, el uso de un MIC de 100 µg/ml de PZA permite la aparición de falsos-resistentes. Otro ejemplo es el caso de las cepas de la conocida familia W-Beijing, caracterizada por su multidrogo-resistencia y su rápida diseminación a nivel mundial. Estas cepas presentan la mutación Thr47Ala en el gen *pncA* que confiere resistencia a PZA, es una mutación rara reportada solo en las cepas de esta familia y que no es determinada como resistente por el BACTEC™-460TB (46).

En cuanto a las limitaciones del SSCP, además de no ser capaz de detectar en su totalidad las mutaciones presentadas en el gen *pncA* bajo las condiciones trabajadas, requiere de equipos y personal entrenado en técnicas de Biología Molecular. Los

costos de los equipos pueden ser similares a los de otras técnicas de diagnóstico implementadas en los servicios de salud como el ELISA.

En cuanto a detalles de la técnica, las condiciones del SSCP que permitieron su aplicación fueron principalmente: el uso del gel MDE; que presentó una mayor resolución en la separación de los conformeros de hebra simple; comparado con los geles de poliacrilamida convencional, el tiempo de duración de la corrida y el mantenimiento de una temperatura fría.

Recientemente, se ha aplicado el ensayo de sondas de línea mediante hibridización reversa (LiPA) y se ha desarrollado la prueba REMA (Resazurin Microtitre Assay) basada en el cultivo, para determinar la susceptibilidad a PZA en *M. tuberculosis*, cuya factibilidad, así como valores de sensibilidad y especificidad tendrían que ser evaluados en una realidad como la nuestra (14, 47).

V. CONCLUSIONES

1. El SSCP permitió determinar la susceptibilidad a PZA en cepas de *M. tuberculosis* a través de la detección de mutaciones en el gen *pncA*.
2. El SSCP es altamente específico (98%) y sensible (85%), aunque su sensibilidad es menor al test de Wayne (91.4%) y el secuenciamiento (92.6%). El SSCP fue la técnica más rápida y más económica que el BACTEC™-460TB y el secuenciamiento del gen *pncA*.
3. El 92.6% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA contenían una mutación en el gen *pncA*. Las mutaciones en este gen son el principal mecanismo de resistencia a PZA en los aislamientos clínicos estudiados.

VI. RECOMENDACIONES

1. En este estudio, las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH y RIF presentaron un alto nivel de resistencia a PZA y una gran proporción de pacientes VIH-positivo incluidos en el estudio se encontró infectada con este tipo de cepas, por lo tanto se podría aplicar la prueba del SSCP en pacientes VIH y otros pacientes inmunosuprimidos diagnosticados con TB, donde la determinación temprana de la resistencia a PZA es crítica en el establecimiento del esquema terapéutico.
2. Estandarizar la prueba del SSCP directamente en muestras de esputo, lo que generaría una prueba de detección aun más rápida, obviando el tiempo prolongado de crecimiento de la bacteria y permitiendo una optimización de la terapia antituberculosa. Además, de reducir el riesgo asociado a la manipulación de cepas de *M. tuberculosis*, dado que en las muestras de esputo la carga bacteriana es menor en muchos grados de magnitud.
3. La especificidad (95.8%) y sensibilidad (91.4%) del test de Wayne observadas en este estudio lo presentan como una buena alternativa para determinar la susceptibilidad en lugares donde no se cuente con recursos suficientes para implementar pruebas de diagnóstico molecular.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO Press.
2. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:540-543.
3. World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents: Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings. WHO Press. 2007.
4. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 2291-2295.
5. Singh P, Wesley C, Jadaun GP, Malonia SK, Das R, Upadhyay P, et al. Comparative Evaluation of Löwenstein-Jensen Proportion Method, BacT/ALERT 3D System, and Enzymatic Pyrazinamidase Assay for Pyrazinamide Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:76-80.
6. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. J Antimicrob Chemother. 2006; 58: 327-331.
7. Krishnamurthy A, Almeida D, Rodrigues C, Mehta A. Comparison of pyrazinamide drug susceptibility of *M. tuberculosis* by radiometric BACTEC and enzymatic pyrazinamidase assay. Indian J Med Microbiol. 2004; 22 (3):166-168.
8. Juréen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 52:1852-1854.

9. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996; 2(6):662-7.
10. Park SK, Lee JY, Chang CL, Lee MK, Son HC, Kim CM, et al. *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infect Dis*. 2001; 1:4.
11. Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61:123 – 127.
12. Vásquez-Campos L, Asencios-Solis L, Leo-Hurtado E, Quispe-Torres N, Salazar-Lindo E, Bayona J, Becerra MC. Drug resistance trends among previously treated tuberculosis patients in a national registry in Peru, 1994-2001. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8:465-72.
13. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003; 7:6-21.
14. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58:327-31.
15. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*. 1999; 181:2044-9.
16. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:2736-8.

17. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:528-32.
18. Miyagi C, Yamane N, Yogesh B, Ano H, Takashima T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48:111-6.
19. Barco P, Cardoso RF, Hirata RD, Leite CQ, Pandolfi JR, Sato DN et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:930-5.
20. Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:1764-6.
21. Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, Nodieva A, Marga O, Skenders G. Spectrum of *pncA* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:3209-10.
22. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:636-40.
23. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *FEBS J.* 2008; 275:753-62.
24. McClatchy JK, Tsang AY, Cernich MS. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 20:556-7.

25. Laszlo A, Gill P, Handzel V, Hodgkin MM, Helbecque DM. Conventional and radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1983 Dec;18(6):1335-9.
26. Beckton Dickinson. BACTEC™ PZA Test Medium Culture Vials. 2007.
27. Miller MA, Thibert L, Desjardins F, Siddiqi SH, Dascal A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. J Clin Microbiol. 1995; 33:2468-70.
28. Denkin S, Volokhov D, Chizhikov V, Zhang Y. Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2005; 54:1127-31.
29. Pfyffer GE, Palicova F, Rüsch-Gerdes S. Testing of susceptibility *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol. 2002; 40:1670-4.
30. Miranda J, Rios R, Mattar S, Alvis Nelson. Concordancia de métodos para susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Montería, Córdoba: tubo indicador de crecimiento micobacteriano vs. método de las proporciones múltiples. Colomb Med. 2008; 39:147-53.
31. Bemer P, Bodmer T, Munzinger J, Perrin M, Vincent V, Drugeon H. Multicenter evaluation of the MB/BACT system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2004; 42:1030-4.
32. van Klingeren B, Dessens-Kroon M, van der Laan T, Kremer K, van Soolingen D. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of a high-throughput, reproducible, absolute concentration method. J Clin Microbiol. 2007; 45:2662-8.
33. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Atlanta: Center for Disease Control; 1985.

34. Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl*. 1992; 9:73-9.
35. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP). 2003. Disponible en: URL: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Parker/method.html>. Consultado Agosto 10, 2008.
36. Davies AP, Billington OJ, McHugh TD, Mitchison DA, Gillespie SH. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:3686-8.
37. McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas II, Graviss EA, et al. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:2210-7.
38. Takii T, Hamasaki S, Hirano K, Abe C, Onozaki K. Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:804-7.
39. Fredricks BA, DeCoster DJ, Kim Y, Sparks N, Callister SM, Schell RF. Rapid pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry. *J Microbiol Methods*. 2006; 67:266-72.
40. Parrish N, Osterhout G, Dionne K, Sweeney A, Kwiatkowski N, Carroll K, et al. Rapid, standardized method for determination of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility by use of mycolic acid analysis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:3915-20.
41. Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, Cama R, Caviedes L, Hopper T, et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in peruvian children by use of a heminested IS6110 polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis* 2003; 36:16-23.

42. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. J Clin Microbiol. 1998; 36:362-6.
43. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991; 29:2578-86.
44. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world fourth global report . 2008. WHO Press.
45. Aragón LM, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. Evaluation of the BacT/ALERT PZA kit in comparison with the BACTEC 460TB PZA for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to pyrazinamide. J Antimicrob Chemother. 2007; 60:655-7.
46. Dormandy J, Somoskovi A, Kreiswirth BN, Driscoll JR, Ashkin D, Salfinger M. Discrepant results between pyrazinamide susceptibility testing by the reference BACTEC 460TB method and *pncA* DNA sequencing in patients infected with multidrug-resistant W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains. Chest. 2007; 131:497-501.
47. Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, et al. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol. 2007; 45:2802-7.

ANEXO 1

Preparación de soluciones y buffers

Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Para preparar un litro de solución se disuelve 100 g de SDS en 900 ml de agua ultrapura. Se calienta a 68°C para ayudar a disolver. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl concentrado. Completar el volumen a 1 L y dispensar en alícuotas. No es necesario esterilizar.

CTAB/NaCl

Bromuro de cetiltrimetilamonio	10.0 %
Cloruro de Sodio	0.7 M

Buffer TE

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

Buffer formamida

Formamida	95.0 %
NaOH	10.0 mM
EDTA	20.0 mM
Azul de bromofenol	0.05 %

Buffer TBE 5X (solución stock)

Tris base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20.0 ml
Agua c.s.p.	1.0 L

ANEXO 2

Preparación de gel MDE 0.8X (30 ml)

Agua ultrapura	14.4 ml
Buffer TBE 5X	3.6 ml
solución MDE 2X	12.0 ml
TEMED	70 µl
APS 10%	70 µl

Mezclar el agua y el buffer. Adicionar la solución MDE y homogenizar. Adicionar el TEMED y el APS. Homogenizar suavemente. Verter la solución en el soporte de gel con ayuda de una pipeta, tener cuidado de no introducir burbujas. Introducir el peine. Esperar a que gelifique.